Einige Beobachtungen über die photodynamische Wirkung auf Zellen (Paramäcien).

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ferdinand Osthelder
Medizinalpraktikant.

München 1907.
Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Einige Beobachtungen über die photodynamische Wirkung auf Zellen (Paramäcien).

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ferdinand Osthelder
Medizinalpraktikant.

München 1907.
Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität München.

Referent:

Herr Professor Dr. von Tappeiner.

Meinem Vater
und dem Andenken
meiner Mutter

gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548322_0053

Der Einfluß des Lichtes auf die organische Welt ist längst bekannt. Ohne die Sonne gäbe es kein Leben auf der Erde. Sie bedingt je nach ihrer Leuchtkraft zum großen Teil die Rassenunterschiede der Menschen. Stärkeres oder schwächeres Licht, Nebel oder ein blauer Himmel haben auf unser Gemüt einen wesentlichen Einfluß. Albrecht Dürer schrieb an einen Freund, als er aus Italien nach Deutschland zurückkehrte: „O wie wird mich nach der Sonne frieren!“ Und Goethe spricht von sich: „Meine Natur schließt sich wie die Blume, wenn die Sonne schwindet.“ Wir wissen, daß der Aufbau der grünen Pflanzen mit Hilfe des Chlorophylls nur im Sonnenlichte stattfindet. Höhlentiere, die sich nur im Dunkeln aufhalten, bekommen rudimentäre Augen. Polarnächte verursachen eine Anämie. Die Sonne baut und sie zerstört. Zu starke Licht- und Wärmebestrahlung bringt Sonnenstich und Hitzschlag. Von hohen Schneebergen kommen manche Menschen mit dem Gletscherbrand zurück. Die Sonne verändert Farbstoffe,

die Sonne wirkt bleichend. So könnte man aus dem alltäglichen Leben zahlreiche Beispiele nehmen, um die Wirkung der Sonne zu illustrieren.

Sonnenbäder waren bei den alten Römern schon im Gebrauch. Zur Heilung von Krankheiten gemäß wissenschaftlicher Studien wird das Licht, Sonnenlicht oder künstliches Licht, erst seit einigen Jahrzehnten verwendet, als die Physik nähere Aufschlüsse über das Licht gebracht hatte.

Das Sonnenlicht besteht aus einem Gemenge von Strahlen. In den Regenbogenfarben haben wir die unserem Auge sichtbaren Strahlen; es gibt aber noch Strahlen über Rot und unter Violett, die keine Lichtempfindung in unserem Auge erwecken, ultrarote und ultraviolette Strahlen.

Die Photographie fand, daß die blauen, violetten, ultravioletten Strahlen besonders chemische Wirkung entfalten. Deshalb werden sie zusammengefaßt auch als chemische Strahlen bezeichnet. Die weniger brechbaren Strahlen, hauptsächlich die ultraroten, machen sich nur durch Wärmebildung bemerkbar und heißen demgemäß auch Wärmestrahlen.

Die chemischen Strahlen haben auch auf das tierische Gewebe einen zersetzenden Einfluß, töten Bakterien ab, man nennt sie so auch baktericide Strahlen. Finsen, der frühere Leiter des Kopenhagener Licht-Instituts, be-

mühte sich, die Wärmestrahlen auszuschalten und concentriertes blau-violettes Licht auf Hautinfektionserreger einwirken zu lassen. Aber die Erfolge, welche z. B. bei Lupus erzielt wurden, waren nicht immer zufriedenstellend. Das kurzwellige Licht wird von dem tierischen Gewebe stark absorbiert, und diese Absorption verhindert das Eindringen der Strahlen in tiefere Schichten; sie können daher auf tiefer sitzende Lupusknötchen keinen Einfluß haben. Die langwelligen Strahlen (ultrarot, rot, gelb, grün) dringen bedeutend tiefer in den menschlichen Körper. Durch die Augenlider, ja selbst durch die Hand bemerken wir das Sonnenlicht. Von den langwelligen Strahlen kannten die Biologen bisher im wesentlichen nur die Wärmewirkung. Das änderte sich, als v. Tappeiner zeigte, daß durch den Zusatz gewisser Stoffe, denen als gemeinsame Eigenschaft die Fluorescenz zukommt, auch die roten, gelben, grünen Strahlen eine stark schädigende Wirkung auf einzellige Tiere (Paramäcien) erzeugen können. Fluorescierende Lösungen in Verdünnungen, welche im Dunkeln gar nicht giftig sind, bringen Paramäcien im Sonnenlicht in wenigen Minuten zur Abtötung. Wirksam sind hiebei die Strahlen, welche der fluorescierende Körper absorbiert. v. Tappeiner nennt die Erscheinung, die durch Licht + fluorescierende Stoffe hervorgerufen wird: photodynamische Wirkung. Sie erstreckt sich nicht bloß auf die genannten Infusorien, sondern auch auf Bakterien und Zellen höherer

Ordnung, z. B. Flimmerepithel des Frosches, rote Blutkörperchen, ferner auf Encyme und Toxine. Es wird sich bei dieser Wirkung wohl um eine Energieumwandlung handeln — Uebergang der Strahlenenergie in chemische Energie. In neueren Arbeiten fanden v. Tappeiner und Jodlbauer, daß der Verlauf des Prozesses, wenigstens bei Fermenten und Toxinen, an die Gegenwart von O gebunden ist. Daß aber der Sauerstoff nicht unbedingt nötig ist, die photodynamische Erscheinung hervorzurufen, sahen sie daran, daß eine Reihe von fluorescierenden Stoffen auch in H-Atmosphäre die Lichtwirkung auf die sogenannte Eder'sche Lösung (Quecksilberchlorid + Ammoniumoxalat) bedeutend verstärken kann.

Schon bei der ersten Abhandlung über die Photodynamie der fluorescierenden Stoffe wies v. Tappeiner auf die Analogie dieser biologischen Erscheinung und der Sensibilisierung photographischer Platten hin. H. W. Vogel hat im Jahre 1873 die bedeutsame Entdeckung gemacht, daß man Bromsilbergelatineplatten, auf die sonst nur die kalten Strahlen (blau, ultraviolett) Einfluß haben, durch Zusatz von gewissen Stoffen auch für langwellige Strahlen empfindlich machen kann. Die tauglichen Stoffe nannte er Sensibilisatoren, den Prozeß selbst bezeichnete er als Sensibilisierung. Er wies nach, daß die Wirkung dabei durch diejenige Strahlenart hervorgerufen wird, welche der beigefügte Farbstoff absorbiert.

Wenn ganz allgemein unter Sensibilisierung die Erhöhung der Empfindlichkeit für die Wirkung von Lichtstrahlen verstanden werden kann, so ist die photodynamische Erscheinung ebenfalls ein Sensibilisierungsvorgang, wenn die Bedingungen für die Wirkungen des Lichtes allein und die des Systems Licht + fluorescierende Stoffe die gleichen sind. Für die Wirkung auf Fermente ist diese Analogie nachgewiesen.

Obwohl über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Zellen eine Reihe von Arbeiten bereits vorliegt, fehlen noch Versuche zur Entscheidung der Frage

I. Ist der Angriffsort der photodynamischen Stoffe extra- oder intracellular?

Ich glaubte diese Frage lösen zu können durch Versuche, bei denen die Zellen längere oder kürzere Zeit vor der Belichtung im Dunkeln mit den Lösungen der photodynamischen Stoffe versetzt wurden. Wäre das Eindringen der Lösungen ins Zellinnere Bedingung der Wirkung, so sollte man annehmen, daß bei den verschiedenen Präparaten Unterschiede bezüglich des Eintretens und der Intensität der photodynamischen Wirkung beständen. In dieser Richtung bewegen sich die nun folgenden Versuche.

Als Versuchsobjekt diente Paramaecium candatum. Die Paramäcien sind einzellige

Tierchen, Protozoen, und gehören in die Reihe der Infusorien. Sie leben in faulenden Flüssigkeiten und sind dem unbewaffneten Auge nur als kleine graue Pünktchen sichtbar. Zum Erkennen von Kern, Wimperhaaren, Vakuolen, Mundöffnung hat man das Mikroskop nötig.

Die Züchtung von Paramäcien im großen wurde folgendermaßen bewerkstelligt. Möglichst reine Kulturen von Paramaecium caudatum wurden in gestandenem Wasser mit Salat gefüttert. Der Salat war vorher gereinigt, kurz in heißes Wasser getaucht und in Gazebäuschchen gefüllt. Die Paramäcien setzen sich in oder an das Bäuschchen. Hebt man dieses mit einer Schnur aus dem Wasser, so kann man durch das abtropfende Wasser eine große Anzahl der Tiere erhalten.

Der Gang der Untersuchung gestaltete sich zunächst in der Weise: Von der Paramäcienabschwemmung wurden je 0,9 ccm in Uhrschälchen pipettiert. Im Dunkeln wurde dann die betreffende Farblösung, und zwar je 0,1 ccm hinzugefügt. Die Tiere blieben bestimmte, längere oder kürzere Zeit in der Lösung in der Dunkelkammer stehen und wurden schließlich alle zu gleicher Zeit ans Licht gebracht. Durch das Mikroskop wurde der Einfluß des Lichtes und des fluorescierenden Farbstoffes verfolgt.

Als fluorescierende Körper kamen zur Verwendung: Eosin, Rose Bengale (Tetrachlortetrajodfluorescinnatrium), dichloranthracen-

disulfonsaures Natrium, Fluorescin-Natrium, Methylenblau und Neutralrot.

Zwecks genauer Kontrolle wurden je zwei Uhrschälchen zu gleicher Zeit mit Farbstoff versetzt und entsprechend mit außen an den Rand geklebten Marken bezeichnet.

Versuch mit Eosin im zerstreuten Tageslichte.

Lösung 0,3460 : 100 Wasser = $^1/_{200}$ mol.

Uhrschälchen enthält 0.9 ccm Paramäcienkultur, dazu 0,1 ccm Eosinlösung. Die Farblösung wird also um das 10fache verdünnt.

1. Zusatz 1 Uhr 05 Minuten in Marke 1 a und 1 b,
2. „ 1 „ 15 „ „ 2 a „ 2 b,
3. „ 1 „ 25 „ „ 3 a „ 3 b,
4. „ 1 „ 35 „ „ 4 a „ 4 b,
5. „ 1 „ 45 „ „ 5 a „ 5 b,
6. „ 1 „ 55 „ „ 6 a „ 6 b,
7. „ 2 „ 05 „ „ 7 a „ 7 b,
8. „ 2 „ 15 „ „ 8 a „ 8 b,
9. „ 2 „ 25 „ „ 9 a „ 9 b.

2 Uhr 30 Min. ans Licht gebracht.

Alle Paramäcien bewegen sich lebhaft in der Lösung.

2 „ 50 „ stellen sie die Lokomotionen ein und rotieren an Ort und Stelle um ihre Längsachse. Ein Unterschied in den Schälchen 1—9 ist nicht zu erkennen.

3 „ — „ nur mehr schwache Rotationen. Die Paramäcien nehmen Farbstoff auf.

3 „ 08 „ auch die Rotationen sistieren, die Tiere sind in ihrer Gestalt verändert, zumeist sind aus ihrem Körper grosse helle Blasen gequollen.

3 „ 30 „ Zerfall der Tiere. Bei 1 und 9 gleiches Bild.

Da beim zerstreuten Tageslicht die Eosinwirkung nur sehr langsam einsetzt und auf

diese Weise eventuelle Unterschiede verdeckt werden könnten — was bei einem raschen Eintritt der Lösungen ins Zellinnere leicht möglich wäre — wurde der Versuch in der Sonne wiederholt, weil hiebei der Eintritt der Lichtreaktion viel rascher ist.

Versuch mit Eosin in der Sonne.

Lösung die gleiche wie früher.

10 Uhr 15 Min. 1 a und 1 b,
10 „ 20 „ 2 a „ 2 b,
10 „ 25 „ 3 a „ 3 b,
10 „ 30 „ 4 a „ 4 b.

Sofort ans Licht gebracht, bewegen sich alle Paramäcien ohne Schaden erkennen zu lassen. Doch schon nach 3′ hören die Fortbewegungen bei 1 wie 4 auf, den Tierchen gelingt nur mehr die Drehung um ihre Längsachse. Nach 5′ vermögen sie auch das nicht mehr. Nach 10—15′ beginnt der Zerfall.

Nachdem auch der Versuch mit Eosin in der Sonne keine Unterschiede erbracht hatte, wurden Stoffe gewählt, die viel rascher die photodynamische Erscheinung zeigen, vor allem Rose Bengale und dichloranthracendisulfonsaures Natrium.

Versuche mit Rose Bengale.

a) Lösung 0,01 g in 100 Wasser = $^1/_{10000}$ mol.

Zusatz	Marke
10 Uhr 05 Min.	1 a und 1 b,
10 „ 35 „	2 a „ 2 b,
11 „ 05 „	3 a „ 3 b,
11 „ 35 „	4 a „ 4 b.
11 „ 36 „	dem Licht ausgesetzt. Himmel mässig bewölkt.

11 Uhr 38 Min. Die Paramäcien zeigen nur mehr Rotationen, bei 1—4 gleiche Lähmung.

11 „ 45 „ Die Tierchen liegen in jedem Schälchen tot auf dem Boden. Blasenbildung, Zerfall, Färbung.

b) Lösung $^1/_{50000}$ mol.

Mischung	Marke
12 Uhr 28 Min.	1 a und 1 b,
12 „ 35 „	2 a „ 2 b,
12 „ 40 „	3 a „ 3 b,
12 „ 45 „	4 a „ 4 b.

Sofort ans Licht. Trüber Tag.

12 Uhr 55 Min. Die Fortbewegung hört auf, die Tierchen rotieren nur mehr. Einzelne Exemplare liegen wie tot, In 4 a rotieren noch fast alle Tierchen, bei 1 a verhalten sich mehrere regungslos. Dagegen erscheinen in 4 b mehr Tierchen leblos als in 1 b.

1 „ — „ Fast keine Rotationen mehr.

1 „ 15 „ Einzelner Zerfall. Mannigfache Gestalt, Vorquellen von Blasen.

1 „ 45 „ Allgemeiner Zerfall. Man vermag keine Variation in den Schälchen festzustellen.

Rose Bengale.

c) Lösung $^1/_{200000}$ mol.

3 Uhr — Min.	1 a und 1 b,
3 „ 05 „	2 a „ 2 b,
3 „ 10 „	3 a „ 3 b,
3 „ 15 „	4 a „ 4 b.

Blauer Himmel.

Nach 5′ Einstellung der Bewegung gleichzeitig bei fast allen Tieren. Bei stärkerer Vergrösserung sind noch die Rotationen zu erkennen. Nach 10′ wachsen einigen schon Blasen. Nach 15′ Zerfall.

Versuch mit Rose Bengale von noch stärkerer Verdünnung unter Benutzung des elektrischen Lichtes.

Lösung $^1/_{1000000}$ mol.

Marke

Ansatz: 10 Uhr — Min. = 4 = 4h im Dunkeln stehen gelassen.
11 „ — „ = 3 = 3h „ „ „ „
1 „ 59 „ = 1 = 1′ „ „ „ „
1 „ 59 „ = 1 = 1′ „ „ „ „
0
0 } = 0,9 ccm Par ohne Farbstoff zur Kontrolle

2 Uhr — Min. Schälchen ins elektrische Licht gestellt.

2 „ 05 „ Die Tiere in sämtlichen Präparaten zeigen gute Fortbewegung.

2 „ 10 „ Schälchen 0 wie 3, 4, 1.

2 „ 15 „ Keine Veränderung.

2 „ 23 „ Gleiches Verhalten wie vorher.

1 „ 30 „ In den Schälchen 4, 3, 1 schwimmen mehrere Tiere schwerfällig, langsam und rotierend. Man möchte glauben, dass die Schädigung in den Präparaten 1 eher stärker und verbreiteter ist als in 3 und 4. Immerhin schwimmen auch in 1 die meisten Tiere noch wie normal. Schälchen 0 verhält sich wie zu Anfang.

2 „ 35 „ Allgemeine Rotation in 4, 3 und 1, die Tiere können sich nicht mehr fortbewegen, sie haften stets am gleichen Platz und wälzen sich um ihre Längsachse. Die meisten haben Flaschenform. In dem einen Präparat von 1 ist die Gestaltveränderung stärker, einige Tiere liegen recht breit geworden regungslos wie tot, zeigen Auswüchse und Zerfall. Präparat 0 normal.

2 „ 43 „ Die meisten Tiere liegen, in ihrer Form stark verändert, regungslos am Boden des

Schälchens. Einige Exemplare rotieren noch sehr lebhaft, kommen noch etwas vom Fleck, andere rotieren nur mehr schwach, vereinzelte lassen deutlich die Flimmerbewegung erkennen. 4, 3, 1 sind nicht auseinander zu halten. Schälchen 0 normal.

2 Uhr 50 Min. Schälchen 0 normal wie zu Anfang.

In den mit Farbstoff versetzten Präparaten sind nur mehr ganz wenig und schwach rotierende Tiere Die meisten sind tot und in ihrer Gestalt verändert, mannigfach aufgequollen und, während sie normal langgestreckt sind (daher der Name das der Länge nach Hingestreckte) jetzt fast so breit als lang.

3 „ — „ Dasselbe Aussehen.

Resultat: Obwohl die Tiere zeitlich sehr verschieden lange Zeit, 4 Stunden, 3 Stunden und 1 Minute, im Dunkeln in der Farblösung gehalten wurden und die Rose Bengalelösung sehr verdünnt $^1/_{10000000}$ mol) war, so starben sie im Licht dennoch in gleicher Zeit und unter ganz gleichen Erscheinungen.

Versuche mit Dichloranthracendisulfonsäure.

a) Lösung 0,045 : 100 Wasser = $^1/_{1000}$ mol.

10 Uhr — Min. 1 a und 1 b,
10 „ 05 „ 2 a „ 2 b,
10 „ 10 „ 3 a „ 3 b,
10 „ 15 „ 4 a „ 4 b.

Trüber Tag.

Dem Licht ausgesetzt tritt nach 25′ bei allen Paramäcien zur selben Zeit Stillstand der Bewegung ein.

Dichloranthracendisulfonsäure.

b) Lösung $^1/_{50000}$ mol.

11 Uhr 15 Min. 1 a und 1 b,
11 „ 20 „ 2 a „ 2 b,
11 „ 25 „ 3 a „ 3 b,
11 „ 30 „ 4 a „ 4 b.

Sonnenschein.

Nach 3′ schon Lähmung, nach 6′ sind mit stärkerer Vergrösserung nur mehr bei wenig Tierchen Rotationen zu sehen, die meisten verhalten sich ganz still, einzelne zeigen auch Blasenbildung. Zwischen 1—6 kein Unterschied. Nach 10′ zumeist Zerfall.

Da auch die stark und rasch photodynamisch wirkenden Lösungen von Rose Bengale und Dichloranthracendisulfonsäure keine Unterschiede ergaben, wurden Versuche angestellt mit Stoffen, von denen sicher bekannt ist, daß sie vital Zellen färben: Methylenblau und Neutralrot.

Versuch mit Methylenblau.

Lösung 0,016 : 100 Wasser = $^1/_{2000}$ mol.

12 Uhr 35 Min. 1 a und 1 b,
12 „ 40 „ 2 a „ 2 b,
12 „ 45 „ 3 a „ 3 b,
12 „ 50 „ 4 a „ 4 b.

Klarer Himmel. 12 Uhr 51 Min. in der Sonne.

Nach 5′ Fortbewegung gehemmt. Nach 6′ zeigt sich, obwohl viele Tiere noch sehr lebhaft rotieren, bei fast der Hälfte Blasenbildung. Nach 8′ färben sich die Tiere intensiv blau und es tritt zum Teil schon Zerfall ein. Gleicher Befund bei 1 und 4.

Versuch mit Neutralrot $^1/_{10000}$ mol.

9 Uhr — Min. 4 a und 4 b = 4^h im Dunkeln gehalten.
12 „ 59 „ 1 a „ 1 b = 1′ „ „ „
Nullversuch. Paramäcien ohne Neutralrot: Kontrolle.
1 Uhr — Min. Schälchen in der Sonne (März-Eisensulfatvorlage).
Die Tiere schwimmen lebhaft.
1 „ 02 „ Eintritt der Photodynamie. Tiere in 1 und 4 in gleicher Weise gelähmt.
1 „ 05 „ Aufquellung und Zerfall der geschädigten Tiere. Kontrollpräparat dagegen vollkommen normal.

Die Tiere, die nur 1 Minute im Dunkeln in Neutralrotlösung sich befanden, starben im Licht nicht später als die Tiere, die 4 Stunden lang im Dunkeln in derselben Farblösung gehalten wurden.

Endlich wurde noch ein Körper aus der Fluorescinreihe, das Fluorescin-Natrium, zur Beobachtung herangezogen, weil durch früher noch nicht veröffentlichte Versuche bekannt ist, daß diese Substanz durch Pergament leichter diffundiert als Eosin und Rose Bengale.

Versuch mit Fluorescin.

Lösung 1,88 in 100 Wasser = $^1/_{20}$ mol.

11 Uhr 15 Min. 1 a und 1 b,
11 „ 20 „ 2 a „ 2 b.
11 „ 25 „ 3 a „ 3 b,
11 „ 30 „ 4 a „ 4 b.

Sonnenschein, Grossstadtdunst.

10′ dem Lichte ausgesetzt, stellen bereits einzelne Tiere die Bewegung ein. Doch bieten auch hier 1 und 4 keine wesentlichen Unterschiede. Gegen 12 Uhr fast allgemeiner Stillstand. Mit stärkerer Vergrösserung bemerkt

man noch kräftige Rotationen, bei einzelnen Exemplaren auch sehr lebhafte Flimmerbewegung. 12 Uhr 25 Min. beginnt die Blasenbildung, ein Paar Tiere drehen sich noch um ihre Achse. 12 Uhr 30 Min. überall Zerfall.

Nach dem Ausfall unserer Beobachtungen dürfen wir sagen: Die photodynamische Wirung von fluorescierenden Stoffen + Licht macht sich auf Paramäcien zu gleicher Zeit und in gleicher Weise geltend, ganz gleichgültig, ob die Tiere vorher im Dunkeln kurze oder lange Zeit in der Lösung waren.

Mikroskopisch konnte man bei Zusatz von Eosin oder Rose Bengale bei den Tieren, solange sie nicht geschädigt waren, keinen Farbstoff in ihrem Körper erkennen, auch wenn sie vorher im Dunkeln über 3 Stunden in der Farblösung standen. Allerdings ist hiebei zu berücksichtigen, daß die Untersuchung der Paramäcien in der gefärbten Lösung stattfand und eine Färbung daher nur dann wahrzunehmen ist, wenn die Konzentration des Farbstoffs in der Zelle größer ist als in der Außenlösung. Ist sie geringer, dann können die Tiere, trotzdem Farbstoff in ihren Körper eingedrungen ist, dennoch uns ungefärbt erscheinen.

Meine negativen Resultate berechtigen noch nicht zu der Annahme, daß die photodynamische Wirkung keine intracelluläre ist. Denn es können die photodynamischen Lösungen äußerst rasch in die Zelle eindringen und sich daher keine zeitlichen Unterschiede, wie wir sie erwarteten, einstellen. Auch die

mikroskopische Beobachtung läßt einen solchen Schluß nicht zu. Denn die zur photodynamischen Reaktion nötige Konzentration der fluorescierendein Lösung ist, wie bereits bekannt, äußerst gering. Mit Rose Bengale habe ich Versuche angestellt, die sich mit der Frage beschäftigen:

II. Welches sind die niedersten eben noch photodynamisch wirksamen Konzentrationen?

Die Protokolle haben wir der kürzeren Uebersicht halber in einer Tabelle zusammengestellt. Zu bemerken ist, daß die Versuche im Sonnenlicht vorgenommen wurden und daß der kalten Jahreszeit wegen (Dezember) kein Eisensulfat als Vorlage benutzt wurde. Dagegen kam, da die Tiere doch längere Zeit der Sonne ausgesetzt blieben, zur Kontrolle ein Präparat von Paramäcien ohne Zusatz von Rose Bengale-Lösung (Nullversuch) zur Aufstellung.

Konzentration	Rollbewegg. nach	Stillstand nach	Zerfall nach
$^1/_{100000}$ . . .	—	1′	2—5′
$^1/_{500000}$ . . .	—	1′	2—5′
$^1/_{1000000}$ . . .	—	1′	2—5′
$^1/_{7000000}$ . . .	1	5′	10′
$^1/_{4000000}$ . . .	2′	5′	10′
$^1/_{6000000}$ . . .	4—5′	7	12′
$^1/_{8000000}$ . . .	5—7′	10′	12—15′
$^1/_{10000000}$ . . .	7′	12′	15′
$^1/_{20000000}$ . . .	15—20′	25′	28—30′

Konzentration	Rollbewegg. nach	Stillstand nach	Zerfall nach
$^1/_{30000000}$ . . .	20—25′	25′	30′
$^1/_{40000000}$ . . .	30—40′	45′	50′
$^1/_{50000000}$ . . .	40′	45′	55—60′
Nullversuch . .	50′	70—80′	80′

Wir erzielten also im Sonnenlicht photodynamische Reaktion auf Paramäcien noch mit einer Rose Bengale-Lösung von $^1/_{50000000}$ mol.

Unsere Probe, wie hoch man mit der Verdünnung von Rose Bengale gehen darf, um noch Wirkung zu erhalten, wurde auch unter Benutzung des elektrischen Lichtes vorgenommen. Es war von Interesse, die Stärke des elektrischen Lichtes gegenüber dem Sonnenlicht zu messen, zumal wir ob des Winters in unseren weiteren Versuchen zumeist auf das elektrische Licht angewiesen waren.

Die Kohlen-Bogenreflektorlampe des Instituts verbraucht 30 Amp. bei 110 Volt. Die von der Lichtquelle resp. dem Magnalium-Hohlspiegel ausgehenden parallelen Strahlen gehen durch eine Kühlcuvette von 7 cm Breite, in der beständig frisches Wasser zirkuliert, fallen auf einen Planspiegel aus Magnaliumlegierung und werden von diesem senkrecht auf eine darunter befindliche Drehscheibe geworfen. Auf dieser Scheibe kamen die Uhrschälchen aus dem Dunkeln zur Aufstellung. Um die große Wärme auszuschalten, stand über den Uhrschälchen eine Glasschale ange-

säuerter Eisensulfatlösung von einer Schichthöhe von 5,4 cm. Nach Zsigmondy reicht dieselbe hin, den größten Teil der Wärmestrahlen zu absorbieren und zwar bis zu einem Rest von 1,2%. Um die Belichtungsverhältnisse völlig gleich zu gestalten, wurde die Drehscheibe durch einen Motor in langsamen Gang gesetzt.

Da wir nur 6 Schälchen zur Belichtung auf die Drehscheibe bringen konnten, so mußten wir unsere Versuche in mehreren Abteilungen machen. Es wurde deshalb bei jedem neuen Versuch als höchste Konzentration der Rose Bengale-Lösung diejenige wieder genommen, die beim vorhergehenden die niederste war.

Konzentration	Rollbewegung nach	Stillstand nach	Zerfall nach
$^1/_{2000000}$	5—9′	10′	13′
$^1/_{3000000}$	10′	13′	15′
$^1/_{4000000}$	18—20′	20′	25′
$^1/_{5000000}$	20′	25′	25—30′
$^1/_{6000000}$	20′	25′	25—30′
$^1/_{7000000}$	22′	30′	35′
$^1/_{7000000}$	20′	25′	30′
$^1/_{8000000}$	35′	40′	40′
$^1/_{9000000}$	40′	40—50′	55—60′
$^1/_{10000000}$	40′	40—50′	60′
$^1/_{10000000}$	35—40′	40—50′	60′
$^1/_{20000000}$	70′	80′	90′
Nullversuch = Paramäcien ohne Rose B .	0	0	0

Konzentration	Rollbewegung nach	Stillstand nach	Zerfall nach
$^1/_{20000000}$	50′	60 –80′	80—90′
Nullversuch	0	0	0
$^1/_{30000000}$	0	0	0

Im Sonnenlicht erhielten wir in einer Rose Bengale-Lösung von $^1/_{50000000}$ mol noch Reaktion, im elektrischen Licht konnten wir bis zu $^1/_{20000000}$ mol herabgehen. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da das elektrische Licht eben etwas schwächer als das Sonnenlicht ist.

Somit ist gezeigt, daß in der Tat Lösungen, die in dünner Schicht — insbesondere in den Paramäcien — unserm Auge als vollkommen farblos erscheinen, noch photodynamisch wirken können.

Es konnte also durch die im ersten Abschnitte unternommene Versuchsanordnung und deren negativem Ergebnis ein Entscheid nicht getroffen werden, ob die Wirkung inter- oder extracellular ist. In der Literatur finden sich nun zahlreiche Angaben, die das Eindringen von verschiedenen Stoffen, insbesonders Farbstoffen beweisen. S. Prowazek hat die Aufnahme von Neutralrot durch die Mundöffnung der Paramäcien mikroskopisch beobachtet und näher beschrieben. Die Tiere nehmen durch die Mundöffnung Nahrung und Wasser auf, und so gelangt auch der im Wasser gelöste Farbstoff in die Tiere und wird durch Vakuolen- und Protoplasmabewegung

weiter in den Körper verschleppt. Prowazek sah auch, „daß nach einigen Stunden bei Behandlung mit Neutralrot auf beiden Enden sowie in 1—3 Streifen um die Schlundregion dunkelrot gefärbte hyaline Tröpfchen auftraten“ und bemerkt hiezu: „vielleicht Orte besonderer Diffusionsvorgänge, an denen gewisse ergastische Gebilde als Ausscheidungen des Protoplasmas zum Austritt gelangen“. Sehr schön ist die Aufnahme von chinesischer Tusche zu verfolgen. Chinesische Tusche löst sich im Wasser in kleinsten Partikelchen und offenbar fangen sich solche im Mundschlauch der schwimmenden Paramäcien wie in einem Filter und werden durch die sich bildenden Vakuolen in den Körper der Tiere mitgenommen. So sieht man, nachdem die Tiere 1 Minute lang in der mit Tusche versetzten Lösung schwimmen, 1 schwarzen Punkt, der die Größe einer Vakuole einnimmt, bei einigen Paramäcien auch schon 2 Punkte unterhalb der Mundöffnung oder auch noch keinen. Nach 5 Minuten sind schon 5—10 schwarze Pünktchen zu sehen und zwar sind sie alle im hinteren Teil des Tieres angehäuft. Nach 1—3 Stunden ist die Tusche in 20—30 Pünktchen in dem Körper der Tiere zerstreut, sie sind jetzt auch im vorderen Teil des Tieres gelegen. Läßt man die Tiere noch länger in der Tusche — über Nacht —, so steigt die Aufnahme nicht weiter, die Tiere werden nicht ganz schwarz, sie scheiden die Tusche wieder aus. Filtriert man die mit 20—30 Pünktchen versehenen

Tiere aus der Lösung und bringt sie in reines Wasser, so gewinnen sie wieder normales Aussehen. Die Aufnahme von Tusche geht in derselben Weise vor sich, wenn den Tieren Rose Bengale zugesetzt ist. Man kann also nicht schließen, daß durch Rose Bengale die Tätigkeit der Wimperhaare um die Mundöffnung erhöht wird.

Nach Margherita-Traube-Mengarini sollen die Infusorien mit Ausnahme der parasitisch lebenden, von einer impermeablen Schicht umgeben sein, so daß allenfalls nur an der Schlundöffnung eine Osmose eintreten kann. Es ist doch fraglich, ob die Osmose so beschränkt ist. Von vornherein ist anzunehmen, daß die Tierchen, die in Tümpeln leben, durch eine äußere zähe Schicht einen gewissen Schutz von der Natur erhalten haben, sonst hätten sie sich im Kampf ums Dasein kaum halten können. Gleichwohl ist es glaubhaft, daß gewisse Substanzen osmotisch in den Körper eindringen, vielleicht besonders solche, die zugleich die äußere Schicht schädigen. Es zeigt sich gerade bei Verwendung von Neutralrot und Eosin, daß sich die Tiere, sobald einmal eine Schädigung bei Lichteinwirkung zu erkennen ist, nun sehr rasch färben. Vielleicht erfolgt Osmose der fluorescierenden Körper bei Licht in erhöhtem Grade durch die primäre Schädigung der äußeren Schicht. Untersucht man Paramäcien, die einige Stunden im Dunkeln in Eosin und Rose Bengale standen, welche Farbstoffe rot sind, so ist zu An-

fang, wenn die Tiere bei mattem Licht noch keine Schädigung zeigen, wie erwähnt, mikroskopisch kein Farbstoff in ihnen zu erkennen. Man muß jedoch nach der Beobachtung Prowazeks und unserem Tuscheversuch annehmen, daß die Tierchen durch die Mundöffnung auch im Dunkeln Farbstoff aufnehmen. Solange sich die Tiere im Dunkeln aufhalten, schadet diese geringe Aufnahme nichts, wenn der Farbstoff nicht direkt giftig für sie ist. Nach den Versuchen v. Tappeiners und Jodlbauers starben die Paramäcien in Neutralrotlösungen von 1:40000 im Dunkeln nach 9 Stunden. In Rose Bengale und Dichloranthracenlösungen, die in der Dunkelkammer gehalten wurden, blieben die Tiere nach zweimal 24 Stunden ohne jede Lebensveränderung.

Es frägt sich also:

III. Können die in die Zellen eingedrungenen Lösungen und Substanzteilchen photodynamisch wirken?

Wir mußten demnach die Tiere aus den fluorescierenden Lösungen wiederum befreien. Dies suchten wir auf doppeltem Wege zu erreichen, nämlich durch Entfernung der Außenlösung mittels Centrifugierens und Entfernung mittels Filtrierens.

a) Entfernung der Außenlösung durch Centrifugieren.

Versuchsanordnung: 2 ccm Paramäcienabschwemmung wurde in das Centrifugenglas

pipettiert, dazu kam 0,1 ccm der betreffenden Farblösung. Eine bestimmte — längere oder kürzere — Zeit blieben die Tiere im Dunkeln der Einwirkung dieser Mischung überlassen. Alsdann wurde das Glas mit abgestandenem Wasser aufgefüllt und centrifugiert, um die Paramäcien zu Boden zu bringen und das Farbwasser bis auf einen geringen Rest (1—2 Tropfen) abgießen zu können. Mit gestandenem Wasser wurde wiederum aufgefüllt. Dieser Abguß und Nachguß wurde bei den ersten Versuchen 4 mal, später 8- und 12 mal wiederholt. So konnte man annehmen, durch die wiederholten Verdünnungen allen Farbstoff aus der Lösung entfernt zu haben. Um darüber sicher zu sein, kamen zur Kontrolle in 2 Gläschen die photodynamisch wirkenden Lösungen allein. Es wurde wie bei den ersten beiden Gläschen ebenso oft abgegossen und wieder mit Wasser verdünnt. Erst nach der Verdünnung wurden Paramäcien eingebracht. War die Verdünnung entsprechend hoch, so durften diese Lösungen auf die Tierchen keine Wirkung entfalten. Endlich wurden 2 Gläschen zur Kontrolle nur mit Paramäcien beschickt und ebenso oft centrifugiert wie die ersten Präparate, um zu sehen, ob das Centrifugieren allein nicht etwa eine Schädigung für die Tiere bedingt. Nach dieser im Dunkelzimmer vorgenommenen Prozedur wurde der Inhalt der Centrifugengläser in Uhrschälchen übergegossen und in denselben der Sonne oder dem elektrischen Licht ausgesetzt.

Versuch mit Eosin $^1/_{200}$ mol und mit Rose Bengale $^1/_{10000}$ mol (Sonne, ohne Eisensulfatvorlage).

Bezeichnung: E_1 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Eosin, 4h im Dunkeln gehalten, dann viermal zentrifugiert.

R_1 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Rose Bengale, 4h im Dunkeln gehalten, dann viermal zentrifugiert.

P_1 = P_2 = 2 ccm Param. ohne Farbe: Kontrolle zentrifugiert.

E_0 = 2 ccm Wasser + 0,1 ccm Eosin. Verdünnung so hoch wie bei E_1 getrieben, dann 0,1 ccm zentrifugierte Paramäcien hinzugefügt.

R_0 = 2 ccm Wasser + 0,1 ccm Rose Bengale, Verdünnung so hoch wie bei R_1 getrieben, dann 0,1 ccm zentrifugierte Paramäcien hinzugefügt.

12 Uhr 45 Min. Schälchen gemeinsam ins Sonnenlicht (zeitweise Nebelzüge).

12 „ 50 „ Die Tiere zeigen noch normale Bewegung.

1 „ — „ In R_1 bereits viele rotierende Tierchen, einige schon Blasen.
P_1 und P_2 normal, ebenso R_0 und E_1 und E_0.

1 „ 15 „ Die meisten Tiere in R_1 zeigen Zerfall.

1 „ 28 „ Die anderen Präparate weisen keine pathol. Erscheinung auf.

1 „ 40 „ Auch in E_1 Schädigung zu erkennen. Die Hälfte der Tiere rotiert, die anderen schwimmen noch lebhaft.
In E_0 gleiches Verhalten wie P_1 und P_2.

1 „ 45 „ In E_1 allgemeine Rotation. E_0 keine Veränderung.

1 „ 50 „ R_1 alle tot, viele zerfallen.
R_0 wie P_1 P_2 und E_0.

2 „ — „ kein wesentlicher Fortschritt.

2 „ 08 „ In E_1 Gestaltveränderung der Tiere. Blasen

und Zerfall. Eine geringe Schädigung scheint sich auch in E_0 und R_0 sichtbar zu machen.

2 Uhr 15 Min. Auch P_1 und P_2 Schädigung. Dieselbe ist gleich stark wie in E_0 und R_0 langsame Bewegung, zum Teil Rotation und Protoplasmaausstülpung.

2 „ 25 „ Die Schädigung in R_0 und E_0 ist gleich wie bei P_1 und P_2. Sie hat nur wenig zugenommen und ist wohl nur Folge der Wärmestrahlen.

Resultat: Die Tiere, die 4 Stunden im Dunkeln in den fluorescierenden Lösungen von Eosin und Rose Bengale standen, gingen, auch nachdem sie aus der Farblösung befreit waren, unter photodynamischer Einwirkung zugrunde.

Versuch mit Rose Bengale $^1/_{10000}$ mol und $^1/_{50000}$ mol (elektr. Licht).

R_1 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Rose Bengale $^1/_{10000}$ mol. 3h Farbstoff im Dunkeln gehalten, viermal zentrifugiert.

R_2 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Rose Bengale $^1/_{50000}$ mol. 3h im Dunkeln, viermal zentrifugiert.

P_1, P_2 = 2 ccm Paramäcienkultur ohne Farbe, Kontrolle. viermal zentrifugiert.

Rx_1 = 2 ccm Wasser + 0,1 ccm Rose Bengale $^1/_{10000}$ mol viermal verdünnt, Kontrolle nachträglich 0,1 ccm zentrifugierte Param.

Rx_2 = 2 ccm Wasser + 0,1 ccm Rose Bengale $^1/_{50000}$. viermal verdünnt, Kontrolle nachträglich 0,1 ccm zentrifugierte Param.

[Gläschen P_1 nach zweimaligem Zentrifugieren zerschellt, ein neues Gläschen angesetzt.]

3 Uhr 45 Min. Uhrschälchen zusammen ins elektrische Licht. In der ersten Minute bewegen sich die Tierchen normal.

4 „ 12 „ In R_1 Rotation.

4 „ 30 „ Keine weitere Veränderung eingetreten.

4 „ 45 „ In R_1 haben mehrere Tiere Blasen. Beginn des Zerfliessens.

In R_2 bewegen sich alle wie in normalem Zustand.

5 Uhr — Min. Dasselbe Verhalten.

5 „ 15 „ = 1 Stunde 30 Min. In R_1 viele tot. Auch in R_2 stärkere Schädigung. Die Tierchen haben zumeist Flaschenform bekommen, manche tragen Blasen, die wie scheinbar schwere Säckchen anhängen, so dass sie nicht mehr schnell schwimmen können und sich oft überschlagen. P_2 ganz geringe Schädigung (Zentrifugieren) P_1, das nur zweimal zentrifugiert wurde, normal. Ebenso Rx_1 und Rx_2.

5 „ 35 „ = 1 Stunde 50 Min. In R_1 nur mehr ganz wenig Tiere, die noch Leben zeigen, auch R_2 Tote. P_1 Rx_1 Rx_2 normal.

6 „ — „ In R_2 hat die Schädigung noch mehr zugenommen.

6 „ 30 „ Derselbe Befund.

6 „ 50 „ Kaum merkbare Veränderung.

Das Resultat ist das gleiche wie früher. Zugleich ergibt sich, daß die Tiere, die vorher in einer stärkeren Lösung sich befanden, der Lichteinwirkung mehr unterliegen als die aus der schwächeren Lösung.

Versuch (Rose Bengale $^1/_{10000}$ mol) bei 8maligem Centrifugieren.

Bezeichnung:

R_1 R_2 R_3 R_4 = je 2 ccm Param. + je 01 ccm R B $^1/_{10000}$ mol. 3h im Dunkeln gehalten, dann entsprechend zentrifugiert.

P_1 P_2 P_3 P_4 = je 2 ccm Param. ohne Farbe 8mal zentrifugiert } Kontrolle.

R_a R_b R_c R_d = je 2 ccm gestandenes Wasser + je 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol, entsprechend verdünnt. Nachträglich je 0.1 ccm zentrifug. Param. zugesetzt.

P_x = nicht zentrifugierte Paramäcien.

2 Uhr 45 Min. ins elektrische Licht und zwar R_1 R_3 R_4 P_1 P_x R_a (da nur 6 Präparate auf die Drehscheibe gehen).

[R_2 enthielt gar keine Tiere mehr, in R_1 und R_4 nur sehr wenig.]

Nach 2′ kann man noch keine pathologischen Störungen erkennen.

2 „ 55 „ Gleicher Befund. P_x und P_1 nicht verschieden. Die Tiere haben das Zentrifugieren ohne Schaden ertragen.

3 „ 12 „ Blasenbildung in R_1 [R_3 und R_4] Rotation und Absterben. P_x P_1 R_a normale Tiere.

3 „ 30 „ In R_1 die Tiere regungslos. Die meisten zeigen Blasen und Zerfall. In den übrigen Präparaten ist keine Aenderung eingetreten.

Des Resultat ist das gleiche wie bei 4-maligem Centrifugieren.

Versuch (Rose Bengale $^1/_{1000}$ mol) mit 4- und 12maligem Centrifugieren.

Bezeichnung: P_{12}, P_{12} = 2 ccm Param. ohne Farbe 12 mal zentrifugiert } Kontrolle

R_4, R_4 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol 4 mal zentrifugiert

R_{12}, R_{12} = 2 ccm Param. + 0,1 R B $^1/_{10000}$ mol 12 mal zentrifugiert.

Die Tiere wurden diesesmal nur 1′ im Dunkeln in der Farblösung gehalten.

5 Uhr 20 Min. Ins elektrische Licht.

(In allen Präparaten einige Tote, Zentrifugieren. Die Zahl der Paramäcien ist gering.)

5 „ 25 „ Keine pathologische Erscheinung.

5 „ 35 „ Ebenso.

5 „ 50 „ Gleicher Befund.

6 „ 00 „ Die Tiere leben noch alle.

6 „ 15 „ P_{12} wie R_{12} und R_4.

6 Uhr 30 Min. Verhalten wie zu Anfang.
6 „ 45 „ Keine Schädigung zu konstatieren.
7 „ 00 „ „ „ „ „

Resultat: Befinden sich die Tiere nur 1 Minute im Dunkeln in einer Rose Bengale-Lösung von $^1/_{200000}$ mol, so dringt der Farbstoff innerhalb dieser kurzen Zeit entweder überhaupt nicht in das Innere ihres Körpers vor oder was an Farbstoff eingedrungen war, wird durch den Zusatz von Wasser osmotisch wieder entfernt.

Wenn auch die Versuche wohl keinen Zweifel darüber lassen, daß, falls Eosin und Rose Bengale lange Zeit im Dunkeln auf Paramäcien eingewirkt hatten, soviel dieser Stoffe ins Zellinnere eingedrungen war, um photodynamisch zu wirken, so wurde doch noch ein anderer Weg gesucht, dieses mit vollkommener Sicherheit zu beweisen. Durch das häufige Abgießen nahm nämlich die Zahl der zur Untersuchung kommenden Paramäcien sehr stark ab und es waren in den einzelnen Uhrschälchen manchmal nur mehr wenig Tiere zur Beobachtung vorhanden. Dieser 2. Weg bestand in

b) Entfernung der Außenlösung durch Filtrieren.

Es war überraschend zu sehen, daß man die Paramäcien auf einem Filter ganz ähnlich wie eine chemische Substanz auswaschen kann. Schwierig ist es aber, die ausgewaschenen Tiere wiederum vom Filter in ein Uhr-

schälchen zu bringen. Durch einen Kunstgriff konnte ich diese Schwierigkeit beseitigen. Durch Einstellen des Filters in gestandenes Brunnenwasser werden die Tierchen vom Filter abgehoben und können herauspipettiert werden. Um in der Entfernung des Farbstoffes sicher zu gehen, wurden die Paramäcien auf ein 2. Filter gebracht und hier nochmals mit gestandenem Wasser gewaschen. Von diesem 2. Filter erhielt ich immer noch eine große Anzahl der Tiere, gegen 100—300 Exemplare, in die Uhrschälchen, so daß über den Ausgang des Versuches nicht die geringsten Zweifel herrschten.

Versuch mit Rose Bengale $^1/_{1000}$ mol.

$\frac{3}{3}$ = je 2 ccm Param. + je 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
3 Stunden im Dunkeln gehalten, dann im Dunkeln filtriert.

$\frac{1}{1}$ = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
1 Minute im Dunkeln gehalten, dann filtriert.

$\frac{P}{P}$ = 2 ccm Param. ohne Mischung, filtrirt } Kontrolle.

2 Uhr 47 Min. ans elektrische Licht.

Nach 5 Minuten Rotation in 3.

„ 12 „ In 3 noch stärkere Lähmung. Teilweise Blasenbildung.

„ 25 „ Der Unterschied von 3 und 1 oder P ist ganz auffallend. In 3 liegen die Tierchen in der tiefsten Höhlung des Uhrschälchens, haben Flaschenform oder sonst veränderte Gestalt, sind mit hellen Bläschen versehen oder zersetzt. Nur noch wenige rotieren langsam und mit An

strengung. P und 1 zeigen fast lauter gesunde Tiere.

Nach 40 Minuten. Schwache Schädigung in P und 1.

„ 60 „ P und 1 haben sich nur wenig verändert.

„ 1½ Stund. Kaum eine Verschiebung. P und 1 sind nicht zu unterscheiden.

Resultat: Die Tiere, die 3 Stunden im Dunkeln in Rose Bengale standen, gehen auch nach dem Filtrieren unter photodynamischer Einwirkung bald zu Grunde, die Tiere, die nur 1 Minute im Dunkeln in Rose Bengale schwammen, bleiben nach dem Filtrieren unter dem elektrischen Licht ungeschädigt. Somit haben die Tiere, die 3 Stunden in Rose Bengale standen, Farbstoff im Dunkeln aufgenommen und auch nach dem Filtrieren in sich, die Tiere, die nur 1 Minute in der Lösung standen, haben innerhalb dieser kurzen Zeit im Dunkeln entweder keinen Farbstoff aufgenommen oder nur so wenig, daß er durch das Wasser beim Filtrieren wieder ausgespült wird oder nur in minimalster unwirksamer Menge zurückbleibt.

Wir wollten nun bestimmen, wie lange Zeit die Paramäcien im Dunkeln in Rose Bengale stehen müssen, auf daß genügend Farbstoff in ihren Körper eingedrungen ist, der im Licht photodynamische Reaktion hervorruft.

Anordnung des Versuches. R B $^1/_{10000}$ mol.

10 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
10 Min. im Dunkeln gehalten, dann filtriert.

$^1/_2$ = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
$^1/_2$ Stunde im Dunkeln gehalten, dann filtriert.

1 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
1 Stunde im Dunkeln gehalten, dann filtriert.

2 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
2 Stunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
P = 2 ccm Param. ohne Farbe filtriert. } Kontrolle.
11 Uhr 52 Min. Gemeinsam ins elektrische Licht.
[In jedem Schälchen 2—5 kranke Tiere.]

Nach 5 Min. tritt in 2 Rotation ein. In den übrigen Präparaten schwimmen die Tierchen normal.
„ 10 „ Lähmung der Tiere in 2 schon weitgehend. Auch 1 langsamere Bewegung und teilweise Rotation.
„ 20 „ Allgemeine Rotation in 1. Beginn der Rotation in $^1/_2$. P und 10 normal.
„ 30 „ In 2 viele gestorben. Blasen, Zerfall.
„ 40 „ Rotation in $^1/_2$ allgemein. 10 und P sind nicht von einander zu unterscheiden.
„ 50 „ Tiere in 1 Blasen. In $^1/_2$ beginnt die Gestaltveränderung.
„ 1 Std. 10 Min. P. fast wie zu Anfang. In 10 schwimmen die Tiere getragener. In $^1/_2$ sind die meisten gestorben, ungefähr 4 Exemplare (junge Tiere) schwimmen noch geschickt herum.
„ 1 „ 30 „ Keine wesentliche Veränderung.
„ 1 „ 45 „ Die Schädigung in 10 ist jetzt gegenüber P deutlich zu erkennen. Immerhin ist sie gering.
„ 2 „ — „ Fast derselbe Befund.
„ 2 „ 45 „ In $^1/_2$ sowie auch in 10 mehr Tote. In 10 schwimmt noch ungefähr die Hälfte der Tiere gut. In $^1/_2$ sind nur noch vereinzelte gesunde Tiere, die meisten sind zerfallen.

Resultat: Tiere, die nur 10 Minuten im Dunkeln in Rose Bengale gehalten wurden, fanden, aus der Farblösung befreit, im elektrischen Licht nur spät und wenig Schaden. Tiere, die $^1/_2$, 1, 2 Stunden im Dunkeln in der

Farblösung standen, starben unter photodynamischer Einwirkung um so früher, je längere Zeit sie vorher in der Lösung schwammen.

Filtrierversuch mit Eosin. (Märzsonne — Eisensulfatvorlage.)

Eosin dringt in den Körper der Tiere wohl in gleicher Weise ein wie Rose Bengale. Wir ließen Paramäcien 5, 3, $1^1/_2$ Stunden und 10 Minuten im Dunkeln in Eosinlösung ($^1/_{4000}$ mol) stehen, befreiten sie dann im Dunkeln durch Filtrieren und Waschen aus der Farbe und brachten sie unter Vorlage von Eisensulfat ins Sonnenlicht. Zu diesen Präparaten wurden Kontrolltiere gestellt, die ohne Eosinzusatz filtriert waren, und Tiere, denen nach dem Filtrieren Eosinlösung eingetropft war.

Die Tiere, denen nach dem Filtrieren Farbe zugesetzt war, wurden schon nach 2 Min. gelähmt. Nach 5 Min. waren die Rotationen bereits ganz schwach und hatten die Tiere ihre Form stark verändert. Nach 10 Min. waren die meisten Tiere plump aufgequollen, mit Auswüchsen versehen, tot, zum Teil zerfallen.

Die Tiere, die 5 Stunden im Dunkeln in der Farblösung standen und durch Filtrieren aus derselben befreit waren, liessen erst nach Verlauf von 5 Min. Schädigung erkennen. Eine grössere Anzahl, noch nicht die Hälfte der Tiere im Schälchen, fing an langsamer zu schwimmen oder vollführte Rotationen. Nach 10—15 Min. rotierten fast alle Tiere. Nach 20—22 Min. wurden die Umdrehungen langsamer, zum Teil sistierten sie schon ganz. Mehrere Tiere lagen schon unförmig aufgetrieben, tot auf dem Boden der Uhrschälchens. Nach 35 Min. sind nur mehr wenig Tiere zu sehen, die noch Leben haben, schwach rotieren oder mit den Wimpern schlagen. Nach 40—50 Min. sind fast alle Tiere tot.

Den Tieren, die 3 Stunden der Einwirkung von Eosin ausgesetzt waren, erging es wie den Tieren, die 5 Stunden in der Farblösung sich verhielten.

Bei den Tieren, die 1 1/2 Stunden in Eosin schwammen, trat die Schädigung etwas später ein. Auch die Formveränderung verlief langsamer.

Die Tiere, die nur 10 Min. in Eosin belassen waren, fanden erst nach 12—15 Min. leichte Schädigung. Sie nahm nur langsam zu und erst nach 25 Min. war die Rotationserscheinung allgemein. Nach 35 Min. hatten die Tiere zumeist noch schlanke Flaschenform. Nach 40—45 Min. war ihre Gestalt stark verändert und traten zum Teil Auswüchse auf.

Die Kontrolltiere, die nur filtriert waren, verhielten sich 45 Min. lang absolut normal. Dann traten Lähmungserscheinungen auf, die nach 10 Min. langsam aber allgemein zunahmen. Einige Paramäcien zeigten Formveränderung.

Es wurde nun gesehen, ob die Tiere, entsprechend nach längerer Einwirkung des Farbstoffs im Dunkeln, im Licht jedesmal eine um so stärkere Schädigung erfahren.

Versuch mit Rose Bengale 1/10000 mol.

R_{22} = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B 1/10000 mol.
22 Stunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
R_3 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B 1/10000 mol.
3 Stunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert
R_{10} = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B 1/10000 mol.
10 Min. im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
P = 2 ccm Param. ohne Farbe. Filtriert. Kontrolle.

5 Uhr 10 Min. Präparate zusammen ins elektrische Licht.
Nach 5 Min. R_3 wieder Rotation und Gestaltveränderung der Tiere. Flaschenform.
R_{22} P R_{10} gesunde Tiere.
„ 10 „ Schädigung in R_3 allgemein. Zum Teil schon Blasen.
R_{22} P R_{10} gleichen sich.

Nach 20 Min. In R_3 die meisten tot. Einige rotieren noch kraftlos.
In R_{22} ist jetzt auch eine Schädigung zu konstatieren. Doch schwimmen noch viele Tiere wie normal.
P und R_{10} nicht von einander zu unterscheiden.

„ 30 „ Zunahme der gelähmten Tiere in R_{22}.

„ 40 „ Rotation in R_{22} etwas allgemeiner, zum Teil aber noch kräftig.

„ 1 Std. — Min. Keine Verstärkung der Lähmungserscheinungen in R_{22}.
P und R_{10} normal.

„ 1 „ 40 „ In R_{22} mehrere Tote. Die meisten zeigen noch Rotation, ja einige junge Exemplare schwimmen noch gut.
P normal.
In R_{10} Beginn der Schädigung, langsamer Gang, Rotation.

Es ergab sich das sehr unerwartete Resultat, daß die Tiere, die lange Zeit, 22 Stunden, im Dunkeln mit der Rose Bengale in Berührung waren, viel später starben als die Tiere, die 1—3 Stunden in der Farblösung gehalten wurden. Ein 2. Versuch, in dem wir die Tiere 19 Stunden in Rose Bengale beließen, brachte denselben Ausfall. Vielleicht vermögen die Tiere den eingedrungenen Farbstoff in irgend einer Weise zu fixieren. Eine bestimmte Erklärung aber kann nicht gegeben werden.

Nunmehr wurde probiert, ob man den im Dunkeln in die Tiere eingedrungenen Farbstoff durch längeres Stehenbleiben derselben in Wasser wieder osmotisch entfernen kann.

Versuch mit Rose Bengale $^1/_{10000}$ mol.

Anordnung:

P = 2 ccm Param. filtriert, über Nacht im Filter stehen gelassen } Kontrolle.

3 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
3 Stdn. in der Mischung gehalten, dann Farblösung abfiltriert und die Param. im 2. wasserhaltigen Filter stehen gelassen von 6 abends bis 11 früh.

10 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
10 Min. in der Mischung gehalten, dann filtriert und ans elektr. Licht gebracht.

3a = 2 ccm Param. + 0,1 ccm R B $^1/_{10000}$ mol.
3 Stdn. in dieser Mischung gehalten, dann filtriert und ans elektr. Licht gebracht.

11 Uhr 38 Min. Die Präparate zusammen ins elektr. Licht.

Nach 6 Min. in 3a verbreitete Rotation. Die übrigen Präparate normal.

„ 10 „ In 3a die meisten Tiere tot, mit Blasen versehen. Einige rotieren teils mit Anstrengung, teils mit Geschick. In den anderen Uhrschälchen ist keine Veränderung eingetreten.

„ 20 „ 3a noch stärker geschädigt. 3, 10, P gesunde Tiere.

„ 35 „ Leichte Hemmung der Fortbewegung in 10. P und 3 sind sich gleich.

„ 50 „ In 3a fast alle tot und zerfallen.
In 10 die Schädigung deutlicher. Viele haben Flaschenform, einigen sind schon Blasen gewachsen. Gute Schwimmer nur mehr wenige. P wie zu Anfang. Vielleicht auch in 3 leichte Schädigung.

„ 65 „ Keine wesentliche Veränderung. Der Unterschied von 3 und 3a ist ganz frappant.

Resultat: Es wird also der Farbstoff durch das Stehenbleiben der Paramäcien in Wasser osmotisch herausgeschwemmt, oder er wird

von den Tieren (innerhalb längerer Zeit) fixiert und bleibt unschädlich.

Nach unserem Tuscheversuch war es doch auffallend, daß die Tiere, die 10 Minuten in der Farblösung gehalten wurden, nicht früher im Licht Schädigung erfuhren. Wir glaubten, durch die gründliche Waschung im Filter wieder Farbstoff aus den Tieren entfernt zu haben. Erfolgt die Aufnahme von Rose Bengale in gleicher Weise wie die von chinesischer Tusche und nehmen wir an, daß die Tiere ein Drittel des aufgenommenen Farbstoffes durch das Filtrieren verlieren, so wäre es verständlich, daß die Tiere, die nur 5—10 Minuten im Dunkeln Zeit zur Aufnahme von Farbstoff per os hatten, kaum mehr photodynamisch beschädigt werden. Wir verkürzten deshalb das Manöver des Filtrierens von 45 auf 8 Minuten und erwarteten, daß die Tiere, die 5 Minuten lang im Dunkeln in der Farblösung schwammen, beinahe so stark geschädigt wurden als die Tiere, die sich 30 Minuten in der Lösung befanden. Zur Vergewisserung, ob wir aus dem Filter allen Farbstoff durch 6maliges Füllen des Trichters mit gestandenem Wasser entfernt hatten, gossen wir auch 2 ccm der angewandten Farblösung ($^1/_{200000}$ mol) auf ein eigenes Filter, spülten es 6mal in gleicher Weise wie die tierhaltigen Filter mit gestandenem Wasser durch und brachten in den letzten Rest der durch das Filter gelaufenen Flüssigkeit filtrierte Paramäcien = Präparat K. Zu diesem Kontroll-

präparat wurde noch ein 2. Uhrschälchen gestellt, das filtrierte Paramäcien enthielt, die nicht mit Farbstoff in Berührung gekommen waren = P.

Abgekürztes Filtrierverfahren (Dauer 8 Minuten).

Versuch mit Rose Bengale — Märzsonne — Eisensulfatvorlage.

12 Uhr 20 Min. Ins Sonnenlicht.

Die Tiere, die ½ Stde vorher im Dunkeln in Rose Bengale gehalten wurden, stellten nach 5 Min. ihre Lokomotionen ein und verfielen in Rotationen. Nach 8 Min. bekam ihr Körper Flaschenform. Nach 10 Min. werden die Rotationen stark verlangsamt, nach 20 Min. ist die Gestaltveränderung soweit gediehen, dass die Tiere beinahe so breit wie lang sind und die meisten gar keine Rotations- oder Flimmerbewegung erkennen lassen. Nach 25—30 Min. allgemeiner Zerfall.

Die Tiere, die nur 5 Min. im Dunkeln in Rose Bengale schwammen, wiesen erst nach 12 Min. leichte Schädigung auf. Sie begannen langsamer zu schwimmen und vollführten zum Teil Rotationen. Nach 22 Min. ist die Rotation allgemein. Die Flimmerhaare tragen die Tiere nicht mehr fort, sondern halten sie nur mehr rollend in Schwebe. Allmählich schwillt das eine Ende der Tiere an und es entsteht die Keulen- oder Flaschenform. Zugleich werden die Rotationen langsamer. Gewöhnlich ist die Kreisbewegung des dickeren Endes des Tieres grösser. Nach 35 Min. zeigen mehrere Tiere helle Auswüchse. Nach 40 Min. starke Deformierung, Absterben der Tiere.

Die Kontrolltiere verhielten sich 20 Min. normal und gleich. Dann schien es, als ob die Tiere in Präparat K langsamer schwämmen als in Präparat P. Das Bild veränderte sich die nächste Zeit nicht weiter. Nach 35 Min. wurden die Tiere in K dicker und behäbiger, zum Teil

brachten sie es nur mehr zu Rotationen, aber auch Präparat P war geschädigt. Allmählich verwischte sich die Ungleichheit der Präparate, da die Tiere in P starke Zunahme der Schädigung zeigten. Nach 45 Min. war die Rotation in K allgemein. In Präparat P, das massenhaft Tiere enthielt, war auch die Mehrzahl der Tiere zur Fortbewegung unfähig geworden.

Trotzdem wir das Filtrieren sehr rasch vornahmen, so wurden dennoch die Tiere, die 5 Minuten in Farbe gehalten wurden, viel später photodynamisch beschädigt als die Tiere, die wir $^1/_2$ Stunde der Einwirkung des Farbstoffs ausgesetzt hatten. Unsere Annahme, daß wir Farbstoff aus den Tieren durch das Filtrieren wieder wegnehmen, dürfen wir aber nicht fallen lassen. Vielleicht wird der mit den Vakuolen aufgenommene Farbstoff von der Vakuole aus langsam in den Körper osmotisch oder ähnlich einer Resorption vom Darm aus verteilt und dann fester zurückgehalten? Nur bleibt uns unklar, warum die Tiere, die gegen 20 Stunden in Rose Bengale gehalten wurden, nicht mehr, ja sogar weniger Schädigung erfahren als die Tiere, die $^1/_2$—3 Stunden in der Farblösung schwammen.

Versuche mit Dichloranthracen $^1/_{1000}$ mol im elektrischen Licht.

D_{14} = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor. $^1/_{1000}$ mol.
14 Stunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
D_3 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor. $^1/_{1000}$ mol.
3 Stunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
D_{10} = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor. $^1/_{1000}$ mol.
10 Min. im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
P = 2 ccm Param. ohne Dichlor. filtriert.
U = 0,9 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor $^1/_{1000}$ mol.

11 Uhr 50 Min. Präparate zusammen ins elektrische Licht. [In allen Präparaten ausgenommen U einige tote Tiere: Filtrieren.]

Nach 5 Min. D_{14} D_8 D_{10} P gleich. In U sind die Tiere sehr flink und unruhig, als suchten sie zu entfliehen.

„ 10 „ Keine Veränderung.

„ 20 „ In U allgemeine Rotation.
D_{14} und D_8 haben einige Tote mehr wie D_{10} und P. Doch ist die grosse Zahl der Tiere normal.

„ 35 „ In U senken sich die Tierchen in die Tiefe des Schälchens. Die meisten rotieren noch, aber kraftlos. Keine Blasen.
D_8 D_{10} D_{14} P keine weitere Veränderung.

„ 50 „ Es hat nur die Schädigung in U zugenommen.

„ 1 Std. 10 Min. Wie vorher.

„ 1 „ 30 „ Keine wesentliche Verschiebung.

„ 2 „ 30 „ In D_{14} D_8 D_{10} und P geringe Schädigung. Es scheint, als ob diese Schädigung in D_8 am stärksten, in D_{14} und D_{10} stärker als in P ist. Die Mehrzahl der Tiere schwimmt in den genannten Schälchen noch gut.

„ 3 „ — „ Keine Aenderung.

Resultat: Somit ist entweder kein oder nicht genügend Dichloranthracen im Dunkeln in die Paramäcien eingedrungen oder was eingedrungen war, wird osmotisch durch das Wasser wieder ausgespült.

Wiederholung des Versuches bei Sonnenlicht.

Anordnung:

D_8 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor.
3 Stunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert.

D_2 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor.
2S tunden im Dunkeln gehalten, dann filtriert.

D_1 = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor.
1 Stunde im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
D_{10} = 2 ccm Param. + 0,1 ccm Dichlor.
10 Min. im Dunkeln gehalten, dann filtriert.
Pf = 2 ccm Param. ohne Dichlor. filtriert. Kontrolle.
Pu = 2 ccm Param. unfiltriert + 0,1 ccm Dichlor.

12 Uhr 11 Min. standen die Präparate im Sonnenlicht. (Keine Eisensulfatvorlage — Januar.)

12 „ 14 „ Pu Stillstand der Bewegung.

12 „ 20 „ Es schwimmen in D_3 D_2 D_1 D_{10} Pf so ziemlich alle Tiere ordentlich, einzelne namentlich in Pf scheinen durch das Filtrieren beschädigt zu sein. In Pn alle tot. Grosse Blasen, Zerfall.

12 „ 23 „ Keine Aenderung in D_3 D_2 D_1 D_{10} und Pf.

12 „ 28 „ Der gleiche Befund.

12 „ 31 „ Alle Präparate weisen eine leichte Schädigung auf; sie ist in Pf durchaus nicht geringer wie in D_3 oder D_2.

12 „ 45 „ Die meisten Tierchen haben die Kraft zur Fortbewegung verloren. Rotation um Längsachse. Ganz wenige zeigen Blasenbildung. Gleicher Befund in den verschiedenen Präparaten.

1 „ — „ Die Formveränderung nimmt langsam zu. Die Rotationen sind getragen, langsam, vielfach ganz eingestellt. Alle Präparate gleich.

Da keine Eisenvorlage angewandt wurde, so ist die Schädigung wohl nur durch die Wärme hervorgerufen.

Resultat: Das Ergebnis ist somit das gleiche wie bei Anwendung des elektrischen Lichtes.

* * *

Wenn auch die anfangs aufgeworfene Frage, ob der Ort der photodynamischen Wirkung auf Paramäcien intra- oder extracellu-

lar ist, nicht eindeutig beantwortet werden konnte, so stehen doch folgende Sätze fest:

1. Es ist nicht nachzuweisen, daß der photodynamischen Erscheinung bei Zellen eine Periode vorausgeht, während welcher die fluorescierenden Lösungen eindringen müssen, bevor sie ihre Lichtwirkung entfalten können. Denn die Tiere, die vor der Belichtung längere Zeit oder ganz kurz im Dunkeln in den Lösungen waren, starben im Lichte zu gleicher Zeit.

2. Daraus kann aber der Schluß, daß die Wirkung keine intercellulare ist, nicht gezogen werden. Denn die zur Entfaltung der photodynamischen Wirkung nötige Menge kann sehr rasch ins Zellinnere eindringen. Vielleicht geht besonders im Lichte das Eindringen — nach vorhergehender Schädigung der Außenmembran — sehr rasch vor sich.

3. Die zur Entfaltung der photodynamischen Reaktion nötigen Substanzmengen sind äußerst klein. Selbst Konzentrationen von $^1/_{50000000}$ mol von Rose Bengale sind bei Sonnenlicht ausreichend.

4. Somit geht hervor, daß die zur Photodynamie nötigen Substanzmengen in den Paramäcien selbst mikroskopisch nicht feststellbar sind.

5. Daß fluorescierende Stoffe ins Zellinnere eindringen und diese eingedrungenen Lösungen oder Substanzteilchen photodynamisch wirken können, zeigen Rose Bengale- oder Eosin-Versuche, bei denen aus der Außen-

lösung durch wiederholtes Centrifugieren oder durch Abfiltrieren aller Farbstoff entfernt war, wie Kontrollversuche zeigten.

6. Bei Dichloranthracendisulfonsäure gelang der Nachweis des Eindringens nicht. Der Unterschied zwischen den Fluorescinen und diesem Körper liegt vielleicht darin, daß durch das Waschen der Paramäcien diese Substanz besonders leicht den Tieren entzogen werden kann.

Zum Schlusse sage ich Herrn Professor Dr. v. Tappeiner für die Ueberlassung und Leitung der Arbeit, Herrn Privatdozent Dr. Jodlbauer für alle freundliche Unterstützung bei derselben meinen herzlichsten Dank.

Lebenslauf.

Ferdinand Michael Osthelder wurde zu zu Kaiserslautern geboren am 10. August 1879. Er besuchte zu Neustadt a. Hardt die Volksschule und absolvierte daselbst das Gymnasium. Dem Studium auf der Hochschule oblag er in Erlangen, München, Freiburg i. B., Bern. Im August 1906 beendete er zu München sein Approbationsexamen. Im Oktober 1906 war er im Diakonissenhaus Salem zu Bern tätig. Seit November 1906 arbeitete er im pharmakologischen Institut München.